Aus der Klinischen Abteilung des Diabetes Forschungsinstitutes
an der Universität Düsseldorf
Direktor: Prof. Dr. F.A. Gries

Cathepsin D, Cathepsin B und Aminopeptidasen beim sekundären Diabetes mellitus nach Pankreatektomie und bei verschiedenen Formen familiärer Hyperlipoproteinämien

Zellassoziierte und serumabhängige Änderungen in gezüchteten menschlichen Fibroblasten und arteriellen glatten Muskelzellen

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Medizin der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf
vorgelegt von

Liane Brix
1983

Yale
LIBRARY

Aus der Klinischen Abteilung des Diabetes Forschungsinstitutes
an der Universität Düsseldorf
Direktor: Prof. Dr. F.A. Gries

Cathepsin D, Cathepsin B und Aminopeptidasen beim sekundären Diabetes mellitus nach Pankreatektomie und bei verschiedenen Formen familiärer Hyperlipoproteinämien

Zellassoziierte und serumabhängige Änderungen in gezüchteten menschlichen Fibroblasten und arteriellen glatten Muskelzellen

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Medizin der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf
vorgelegt von

Liane Brix
1983

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

Der Dekan der
Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf
gez.: Prof. Dr. Hopf

Referent
gez.: Prof. Dr. Gries

Korreferent
gez.: Prof. Dr. Bojar

Mein Dank gilt allen, die bei der Erstellung dieser Arbeit behilflich waren:

Herrn Prof. Dr. Gries danke ich für die Überlassung des Themas.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. Koschinsky für die ausgezeichnete Betreuung und unermüdliche Hilfsbereitschaft während meiner Arbeit.

Dank gebührt auch allen Mitarbeiterinnen der Klinisch-Experimentellen Gruppe, die mich freundlich unterstützt haben. Insbesondere danke ich Frau Dipl. Biol. Bünting für die sorgfältige Züchtung der Zellinien.

Gewidmet

meinen Eltern

Heinz und Ilse Rinkau

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543915_0080

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1.	Einleitung und Fragestellung	1
2.	Methodik	4
2.1	Material	4
2.2	Serumarten	5
2.3	Zellinien	8
2.4	Vorbereitungen zur Messung der Cathepsin D-, Cathepsin B- und Aminopeptidasen-Aktivität	15
2.5	Bestimmung der Cathepsin D-Aktivität	18
2.6	Bestimmung der Cathepsin B-Aktivität	26
2.7	Bestimmung der Aminopeptidasen-Aktivität	28
3.	Ergebnisse	
3.1	Effekte von Hypercholesterinämiker-seren auf Proteasenaktivitäten in Fibro-blasten von Patienten mit verschiedenen Formen familiärer Hyperlipoproteinämien und von Stoffwechselgesunden	30

Seite

3.2 Effekte des Serums von nicht insulinbedürftigen Diabetikern mit schlechter Stoffwechseleinstellung auf Proteasenaktivitäten in Fibroblasten pankreatektomierter Diabetiker und Stoffwechselgesunder 40

3.3 Effekte des Serums von nicht insulinbedürftigen Diabetikern mit guter Stoffwechseleinstellung auf Proteasenaktivitäten in Diabetikerfibroblasten 47

3.4 Effekte des Serums von nicht insulinbedürftigen Diabetikern mit schlechter Stoffwechseleinstellung, von Hypercholesterinämikern und von Stoffwechselgesunden auf Proteasenaktivitäten in arteriellen glatten Muskelzellen 49

4. Diskussion 53

4.1 Zellgebundene Änderungen der Cathepsin D-, Cathepsin B-und der Aminopeptidasen-Aktivität in mesenchymalen Zellen 53

4.2 Einfluß von Hypercholesterinämikerserum auf die Cathepsin D-, Cathepsin B- und die Aminopeptidasen-Aktivität in mesenchymalen Zellen 55

Seite

4.3 Serumeffekte in Abhängigkeit von der diabetischen Stoffwechseleinstellung auf die Cathepsin D-, Cathepsin B- und die Aminopeptidasen-Aktivität in mesenchymalen Zellen 58

5. Zusammenfassung 62

6. Literaturverzeichnis 66

1. Einleitung und Fragestellung

Beim Diabetes mellitus verschiedener Spezies sind Veränderungen mehrerer Enzyme des Proteinstoffwechsels beschrieben worden. Dabei sind Veränderungen sowohl in der Synthese als auch im Abbau von Proteinen nachgewiesen worden, die mit der Entstehung von Mikro- und Makroangiopathien in Zusammenhang gebracht worden sind.

Eine verstärkte Aktivität der Glykosyltransferase, die bei der Synthese der Basalmembranen von Bedeutung ist, wurde in Nieren alloxandiabetischer Ratten gefunden (29, 30).

In Nieren-, Hirn- und Aortenwandgewebe streptocotocindiabetischer Ratten wurde eine Aktivitätsminderung verschiedener Glukosidasen (saure α-Glukosidase, N-Azetyl-ß-Glukosaminidase, ß-Galaktosidase) nachgewiesen, die sich nach Verbesserung der diabetischen Stoffwechsellage normalisierte (17, 33). Dagegen wurde in der Leber und im Urin dieser Ratten eine erhöhte Aktivität der ß-Galaktosidase und der N-Azetyl-D-Glukosaminidase gefunden (17). Dabei wurden die Störungen des Glykoproteinstoffwechsels in Beziehung zur Genese verschiedener Formen der Mikroangiopathien gesetzt (11, 12, 17, 33, 34).

Eine verminderte Aktivität der lysosomalen N-Azetyl-ß-Glukosaminidase und der sauren Cholesterinesterase ist in frisch aus dem Blut isolierten mononukleären Zellen insulinbedürftiger Diabetiker mit schlechter Stoffwechseleinstellung beschrieben worden. Gleichzeitig war der LDL-Proteinabbau vermindert. Nach mehrtägiger Insulintherapie normalisierten sich die o. g. Enzymaktivitäten und der LDL-Proteinabbau (14, 15).

Von der Düsseldorfer Arbeitsgruppe wurde an humanen kultivierten Hautfibroblasten festgestellt, daß Serum von nichtinsulinbedürftigen Typ II-Diabetikern die Aktivität von Cathepsin D im Vergleich zu Normalserum senkt, die Aminopeptidasen-Aktivität jedoch erhöht. Die Cathepsin B-Aktivität blieb unverändert. Dabei zeigten sich keine zellgebundenen Unterschiede zwischen Fibroblasten von Patienten mit genetisch bedingtem Diabetes mellitus und von Stoffwechselgesunden (37).
Ungeklärt blieb jedoch, ob Veränderungen der Proteasenaktivitäten in mesenchymalen Zellen von Patienten mit sekundärem Diabetes mellitus auftreten und ob die o. g. Serumeffekte auch nach Normalisierung der diabetischen Stoffwechsellage bestehen bleiben.

Eine Verminderung der Cathepsin D-Aktivität ist auch in Fibroblasten von Patienten mit familiärer Hyper-ß-Cholesterinämie unter Einfluß homologer Seren im Vergleich zu Normalseren nachgewiesen worden, während die Cathepsin B- und die Aminopeptidasen-Aktivität sich nicht veränderte. Dabei lag gleichzeitig eine serumunabhängige zellfixierte Verminderung der Cathepsin D- und der Cathepsin B-Aktivität im Vergleich zu Fibroblasten Stoffwechselgesunder vor. Offen blieb, ob diese zellgebundenen Veränderungen spezifisch für die familiäre Hyper-ß-Cholesterinämie sind oder ob diese auch bei anderen Formen familiärer Hyperlipoproteinämien auftreten können.

In arteriellen glatten Muskelzellen Stoffwechselgesunder wurde eine um 1/4 bis 1/10 verminderte Aktivität der o. g. Proteasen im Vergleich zu Fibroblasten Stoffwechselgesunder nachgewiesen. Effekte von Seren nichtinsulinbedürftiger Typ II-Diabetiker oder von primären Hypercholesterinämikern auf die intrazellulären Proteasenaktivitäten sind nicht untersucht worden.

Die Verminderung der Cathepsin D-Aktivität ist am Abbau des Testsubstrates Hämoglobin aufgezeigt worden. Dagegen fehlen Untersuchungen mit einem physiologischen Substrat, dem mesenchymale Zellen normalerweise ausgesetzt sind, z. B. LDL. Dies ist von Bedeutung, da Cathepsin D als Schlüsselenzym für den LDL-Apoproteinabbau angesehen wird (18, 32) und ein gestörter LDL-Abbau in der Gefäßwand in Beziehung zur vermehrten LDL-Ablagerung und damit auch zur Entwicklung atherosklerotischer Veränderungen gebracht worden ist (35).
Zur weiteren Abklärung der Störungen im Proteasenstoffwechsel mesenchymaler menschlicher Zellen sollten folgende Fragen geprüft werden:

1. Liegen zellgebundene Veränderungen der Aktivität von Cathepsin D, Cathepsin B und Aminopeptidasen in Fibroblasten von Patienten mit verschiedenen Formen familiärer Hyperlipoproteinämien im Vergleich zu Fibroblasten Stoffwechselgesunder vor?

2. Unterscheiden sich die Effekte des Hyperlipämikerserums auf die Cathepsin D-Aktivität in Fibroblasten und arteriellen glatten Muskelzellen bei Verwendung von LDL statt Hämoglobin als Enzymsubstrat?

3. a) Wie beeinflußt Serum von Diabetikern mit schlechter Stoffwechseleinstellung die o. g. Proteasenaktivitäten in Fibroblasten sekundärer Diabetiker nach Pankreatektomie und in arteriellen glatten Muskelzellen Stoffwechselgesunder?
   b) Wie wirkt sich eine Normalisierung der diabetischen Stoffwechsellage auf diese Serumeffekte aus?

2. Methodik

2.1 Material

Dulbeccos Modifikation des Eagleschen Mediums (DME) (9, 10) mit 5 mM Glucose; Penicillin-Streptomycin-Lösung (Endkonzentration im Zellinkubationsmedium: Penicillin 50 E/ml, Streptomycin 50 µg/ml); Foetales Kälberserum, phosphatgepufferte physiologische Kochsalzlösung (PBS), Seromed GmbH, München; Falcon-Gewebekulturschalen und -flaschen von Beckton & Dickinson, Heidelberg; ^{125}J-Nateriumjodid (trägerfrei in 0,05 M NaOH) von Amersham Buchler GmbH, Braunschweig; Filter mit 0,22 und 0,45 µm Porendurchmesser, Millipore Corporation, Neu-Isenburg; Natriumdihydrogenphosphat-2-hydrat, Dikalium-hydrogen-phosphat, Natriumnitrit, o-Phosphorsäure, Borsäure, Na_2-EDTA, tri-Na-citrat-2-hydrat, N,N-Dimethylformamid, Dimethylsuphoxid, Brij 35 (w/v), L-Leucin-4-nitroanilid, 4-amino-2,3-dimethylazobenzol, 3,5-Diaminobenzoesäure, Kaliumjodid, Wasserstoffperoxid, Chloroform, Folin-Ciocalteau-Reagenz, Trichloressigsäure, Aktivkohle von Merck, Darmstadt; N-Alpha-Benzol-DL-Arginin-ß-Naphthylamid, ß-Naphtylamin, Dithiothreitol, Desoxyribonucleinsäure aus Kälberthymus von Serva Feinbiochemika, Heidelberg; Mersalylsäure von Sigma Chemie GmbH, München; Quickszint 212 von Zinsser, Frankfurt; LC-Partigenplatten, Behring, Marburg.

2.2 Serumarten

Die verschiedenen Serumtypen wurden aus dem Venenblut von Patienten gewonnen, die vor der Blutentnahme 12 - 15 Std. nüchtern gewesen sind. Benutzt wurden:

1. 7 verschiedene Mischseren von Patienten mit primärer Hyper-ß-Cholesterinämie (HS),
2. 7 verschiedene Mischseren von Diabetikern mit schlechter Stoffwechseleinstellung (DS^-) ohne Ketose (Urinzuckerausscheidung in den vorangegangenen 24 Std. > 10 g),
3. 5 verschiedene Mischseren von sulfonylharnstoffbehandelten Diabetikern mit guter Stoffwechseleinstellung (DS^+) (keine Urinzuckerausscheidung während der vorangegangenen 24 Std., keine Ketose, kapilläre Blutzuckertagesprofile < 150 mg/dl bei ambulanter Kontrolle),
4. 6 verschiedene Mischseren von Stoffwechselgesunden (NS).

Die Konzentrationsbereiche des Glucose-, Cholesterin- und Triglyceridgehaltes dieser verschiedenen Seren sind aus Tabelle 1 ersichtlich. Die Bestimmung der Glucose erfolgte mit der Hexokinase-Methode (Boehringer Mannheim), die des Serumcholesterins mit der Chod-Pap-Methode (Boehringer Mannheim) und die der Serumtriglyceride vollenzymatisch (Boehringer Mannheim).

Tabelle 1

Konzentrationsbereiche des Glucose-, Cholesterin- und Triglyceridgehaltes in 7 Seren von Patienten mit primärer Hyper-ß-Cholesterinämie (HS), 7 Seren von Diabetikern mit schlechter Stoffwechseleinstellung (DS^-), 5 Seren von Diabetikern mit guter Stoffwechseleinstellung (DS^+) und 6 Seren von Stoffwechselgesunden (NS).

Serumtyp	Glucose mg/dl	Cholesterin mg/dl	Triglyceride mg/dl
HS	78-103	243-346	87-136
DS^-	187-290	214-299	171-327
DS^+	110-125	126-209	87-170
NS	70-110	117-205	50-97

Tabelle 2

Alpha-2-Makroglobulin- und Alpha-1-Antitrypsin-Konzentrationen (bestimmt mit LC-Partigenplatten, Behring, Marburg) in je 5 Mischseren von Stoffwechselgesunden (NS), von nicht insulinbedürftigen Diabetikern mit schlechter Stoffwechseleinstellung (DS^-) und von Patienten mit primärer Hypercholesterinämie (HS)

Mittelwert ± SEM

	NS	DS^-	HS
Alpha-2-Makroglobulin (mg/dl)	237± 3	236±6	216±28
Alpha-1-Antitrypsin (mg/dl)	273±10	244±6	269±10

2.3 Zellinien

Zur Anlegung der Fibroblastenkulturen wurde freiwilligen, mit der Biopsie einverstandenen Personen, eine ca. 3 x 3 mm große Hautbiopsie aus dem Oberarm unter sterilen Bedingungen in Lokalanaesthesie entnommen. Die Gewebeprobe wurde mit PBS gewaschen, zerkleinert und in Plastikgewebekulturschalen (60 mm Ø = 28,3 cm^2) in DME + 10 % foetalem Kälberserum im Brutschrank bei 37 ^{o}C in 5 % CO_2/95 % angefeuchteter Luft 3 - 4 Wochen gezüchtet. Das Medium wurde 2 mal pro Woche gewechselt. Nachdem die Fibroblasten einen ersten konfluenten Monolayer gebildet hatten, wurden sie mit 0,05 %iger Trypsinlösung abgelöst und im Verhältnis 1 : 2 auf Gewebekulturflaschen verteilt, wo sie zur weiteren Zellzahlvermehrung nach den o. g. Angaben bis zur 2. - 4. Passage weitergezüchtet wurden. Die Fibroblasten wurden dann in DME + 20 % foetalem Kälberserum (v/v) und 1,28 M $DMSO_4$ in flüssigem Stickstoff eingefroren und hierin bis zum Gebrauch aufbewahrt.

Es wurden folgende Zellinien untersucht:

1. Hautfibroblasten von 11 Patienten mit verschiedenen Formen familiärer Hyperlipoproteinämien (HF) (2 Patienten mit Hyper-ß-Cholesterinämie, 2 Patienten mit Typ III-Hyperlipoproteinämie nach Fredrickson, 3 Patienten mit familiärer Hypertriglyceridämie, 4 Patienten mit familiärer Hyper-α-Lipoproteinämie) (Tab. 3a und b; Abb. 1),
2. Hautfibroblasten von 6 sekundären Diabetikern nach Pankreatektomie (s.DF) (Tab. 4),
3. Hautfibroblasten von 9 Stoffwechselgesunden (NF) (Tab. 5),

4. eine arterielle glatte Muskelzellinie aus der Aorta abdominalis eines 57jährigen stoffwechselgesunden Mannes, die anläßlich der Operation eines Aortenaneurysmas gewonnen wurde.

Die Zellinien Nr. 1 und 2 in Tabelle 3a wurden von Prof. Steinberg, University of California, San Diego, USA, die Zellinien Nr. 3 - 6 in Tabelle 3a von Prof. Canzler, Medizinische Hochschule Hannover und die Zellinie Nr. 7 in Tabelle 3b von Prof. Barth, Universität München, zur Verfügung gestellt. Die übrigen Zellinien stammen von Spendern, die in der Klinischen Abteilung des Diabetes-Forschungsinstitutes Düsseldorf betreut werden.

Die Primärkultur der arteriellen glatten Muskelzelllinie wurde im Zellkulturlabor von Prof. Ditschuneit, Universität Ulm, in typischer Weise angelegt (25). In der 3. - 4. Passage wurde ein Teil dieser Zellinie ins Diabetes-Forschungsinstitut Düsseldorf überführt, hier entsprechend den genannten Bedingungen weitergezüchtet und bei -196 ^{o}C aufbewahrt.

Für die Untersuchungen wurden Zellen in der 3. - 7. Passage benutzt. In diesem Bereich waren keine passagebedingten Unterschiede feststellbar.
Alle Zellinien waren frei von Mykoplasmenkontaminationen (2).

Klinische, für die Zellkultur relevante Daten der Zellinien verschiedener Hyperlipämiker, sekundärer Diabetiker und Stoffwechselgesunder sind aus den Tabellen 3 - 5 ersichtlich.

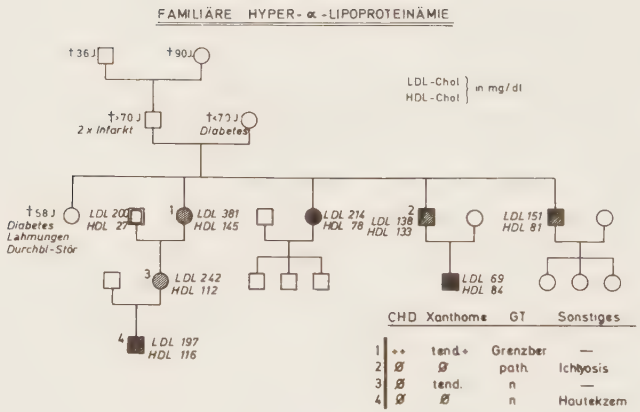

Abb. 1

Stammbaum einer Familie aus Niedersachsen mit vertikaler Transmission einer Hyper-α-Lipoproteinämie über mindestens 3 Generationen.

Tabelle 3a

Zellinien (Hautfibroblasten) von Patienten mit verschiedenen Formen primärer Hyperlipoproteinämien (HLP)

HLP-Art	familiäre HLP-Belastung	Geschlecht	Alter (Jahre)	HLP-Dauer seit Diagnose (Jahre)	HLP-Spätschäden
Hyper-LDL-Cholesterinämie	bd. Eltern 1 Schwester	w	19	10	Herzinfarkt
Hyper-LDL-Cholesterinämie	bd. Eltern 1 Schwester	w	21	11	Herzinfarkt
Hyper-LDL Cholesterinämie	s. Abb. 1	w	53	12	Herzinfarkt
Hyper-HDL-Cholesterinämie	s. Abb. 1	m	51	6	koronare Herzkrankheit
Hyper-HDL+LDL-Cholesterinämie	s. Abb. 1	w	31	6	keine
Hyper-HDL+LDL-Cholesterinämie	s. Abb. 1	m	11	1	keine

Tabelle 3b

Zellinien (Hautfibroblasten) von Patienten mit verschiedenen Formen primärer Hyperlipoproteinämien (HLP)

HLP-Art	familiäre HLP-Belastung	Geschlecht	Alter (Jahre)	HLP-Dauer seit Diagnose (Jahre)	HLP-Spätschäden
Hyper-VLDL-Triglyceridämie	Mutter 1 Schwester	m	34	10	koronare Herzkrankheit
Hyper-VLDL-Triglyceridämie	Vater 1 Bruder 1 Tochter	m	46	16	koronare Herzkrankheit
Hyper-VLDL-Triglyceridämie	Mutter 1 Schwester 1 Tochter	m	48	14	koronare Herzkrankheit, art. Durchblutungsstörungen, Apoplex, Hypertonie
Hypercholesterin + triglyceridämie (Typ III n. Fredrickson)	Vater	m	62	13	Herzinfarkt, Hypertonie, Xanthome, periph. art. Durchblutungsstörungen
Hypercholesterin + triglyceridämie (Typ III n. Fredrickson)	Vater 1 Bruder 1 Schwester	w	63	19	Herzinfarkt, Hypertonie, Xanthome, periph. art. Durchblutungsstörungen

Tabelle 4

Zellinien (Hautfibroblasten) von Patienten mit sekundärem insulinpflichtigem Diabetes mellitus (s.D.) nach totaler Pankreatektomie

Geschlecht	Alter (Jahre)	Vorerkrankung	s.D.-Dauer (Monate)
m	41	Pankreatitis	24
m	42	Pankreatitis	24
m	44	Pankreatitis	30
m	45	Pankreatitis	18
m	48	Pankreatitis	42
w	52	Pankreaskopf-karzinom	1

Tabelle 5

Zellinien (Hautfibroblasten) von 9 Stoffwechselgesunden

Geschlecht	Alter (Jahre)
m	19
m	22
w	27
m	31
m	33
m	37
w	41
m	44
m	49

2.4 Vorbereitung zur Messung der Cathepsin D-, Cathepsin B- und Aminopeptidasen-Aktivität

Für alle Untersuchungen wurden Fibroblasten und arterielle glatte Muskelzellen in standardisierter Weise in Zellkulturschalen von 100 mm Ø = 78,5 cm^2 in 7 ml DME + 10 % Humanserumzusatz (v/v) bei 37 °C in 5 % CO_2/95 % angefeuchteter Luft 6 - 8 Tage bis zur Konfluenz gezüchtet. Das Inkubationsmedium wurde alle 2 Tage gewechselt, zum letzten Mal 24 Std. vor Versuchsbeginn.
Die verschiedenen Zellinien wurden von Frau Dipl. Biol. Bünting, Klinische Abteilung des Diabetes-Forschungsinstitutes Düsseldorf, gezüchtet und für die Versuche zur Verfügung gestellt.

Parallel zu den Zellinien pankreatektomierter Diabetiker oder Hyperlipämiker wurden Kontrollinien Stoffwechselgesunder unter gleichen Bedingungen gezüchtet.

Zu Beginn der Aufarbeitung wurden die Gewebekulturschalen auf 0 °C abgekühlt, Proben des Nährmediums zur Bestimmung der extrazellulären Proteasenaktivitäten entnommen und bis zur gleichzeitigen Bestimmung der intrazellulären Enzymaktivitäten bei 0 °C aufbewahrt. Die Zellen wurden 3 mal hintereinander mit eiskalter PBS vorsichtig gewaschen. Mit Hilfe eines Plastikschabers wurden sie anschließend abgekratzt, mit 10 ml eiskalter PBS in ein Plastikröhrchen überführt und bei 4 °C 5 Min. mit 3000xg zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, das Zellpellet in 1 ml PBS aufgeschwemmt und unter Eiskühlung 3 x 5 Sek. ultrabeschallt (Bronson Sonifier Stufe 4). Zwischen den Beschallungsintervallen wurden jeweils 15 Sek. Pause eingelegt, um einer Erwärmung des Homogenates vorzubeugen. Im Anschluß an die Beschallung wurde der Homogenisierstab mit 0,5 ml eiskalter PBS abgespült,

so daß das Endvolumen des Zellhomogenates 1,5 ml betrug. In dem so hergestellten Homogenat wurde die Proteinkonzentration bestimmt (21) und mit PBS eine Verdünnung von 200 µg Protein/ml Zellhomogenat hergestellt. Hieraus wurden Proben zur Bestimmung des DNS-Gehaltes (16) entnommen.

Wirkungsunterschiede verschiedener Seren auf die Proteasenaktivitäten in der gleichen Zellinie wurden mit Hilfe des t-Testes für verbundene Stichproben, Unterschiede der Proteasenaktivitäten zwischen verschiedenen Zellinien mittels t-Test für unverbundene Stichproben auf Signifikanz überprüft.

Abb. 2

Herstellung des Zellhomogenates zur Bestimmung der Cathepsin D-, Cathepsin B- und Aminopeptidasen-Aktivität

Hautfibroblasten oder arterielle glatte Muskelzellen bis zur Konfluenz in DME + 10% Humanserum/78,5 cm^2 gezüchtet (37 °C; 5 % CO_2)

↓

3 x 8 ml PBS ; 0 °C

↓

abgeschabte Zellen in 10 ml PBS; 0 °C
3000xg, 3 Min.; 4 °C

↓

1 ml PBS zum Zellpellet; 0 °C
3 x 5 Sek. ultrabeschallen, 0 °C
Endvolumen 1,5 ml

↓

mit PBS auf 200 µg Protein/ml Zellhomogenat verdünnen

↓

Bestimmung der Proteasenaktivitäten

2.5 Bestimmung der Cathepsin D-Aktivität

Die Messung erfolgte unter Verwendung von ^{14}C-Hämoglobin oder ^{125}J-LDL-Protein (4).

a) ^{14}C-Hämoglobin:

^{14}C-Hämoglobin (spezifische Aktivität 1,3 - 1,7 µCi/mmol) wurde von Dr. Dahlmann, Biochemische Abteilung des Diabetesforschungsinstitutes Düsseldorf nach den Angaben von Roth et al. (26) hergestellt.
Das Standardinkubationssystem enthielt in einem Gesamtvolumen von 0,5 ml/Test 1M Nateriumcitrat-HCl-Puffer pH 3,5, 6 mg ^{14}C-Hämoglobin und 20 µg Zellprotein. Nach einstündiger Inkubation bei 37 °C wurde die Reaktion durch Zugabe von 0,3 ml eiskalter 50 % Trichloressigsäure (w/v) unterbrochen. Die Proben wurden 15 Min. mit 8000xg (Eppendorf-Zentrifuge) und 4 °C zentrifugiert. Ein Aliquot von 0,2 ml wurde dem Überstand entnommen, in ein Szintillationsgefäß mit 15 ml Quickszint überführt und die Radioaktivität im ß-Counter bestimmt. Angegeben wurde die Cathepsin D-Aktivität in CPM/µg DNS.
Je Meßpunkt wurden 3 getrennte Proben untersucht. Leerwertproben wurden parallel zu den Analysen bestimmt und enthielten anstelle des Zellhomogenates PBS.

Abb. 3

Bestimmung der Cathepsin D-Aktivität unter Verwendung von ^{14}C-Hämoglobin als Substrat in 0,5 ml Inkubationsvolumen

1 M Natriumcitrat-HCl-Puffer pH 3,5
6 mg ^{14}C-Hämoglobin
20 µg Protein des Zellhomogenates
60 Min., 37 °C

↓

0,3 ml 50 % TCA; 0 °C
8000xg, 15 Min.; 4 °C

↓

CPM/µg DNS im Überstand

b) ^{125}J-LDL-Protein:

Humane LDL wurde durch Dichteultrazentrifugation bei Dichte d = 1,063 isoliert (13), gereinigt und anschließend durch Filtration (Filter 0,22 µ Porendurchmessen) sterilisiert.
^{125}J-LDL wurde von Dr. Koschinsky, Klinische Abteilung des Diabetes-Forschungsinstitutes Düsseldorf, in Anlehnung an die Jodmonochloridtechnik von Mc Farlane (22) hergestellt. Die jodierte LDL enthielt 1 - 1,5 Jodatome pro Proteinmolekül. Die spezifischen Aktivitäten lagen im Bereich von 230 - 400 CPM/ng Proteinanteil der LDL.

Die Bestimmung der Cathepsin D-Aktivität mit ^{125}J-LDL-Protein erfolgte mit dem gleichen Inkubationsmedium wie bei Verwendung von ^{14}C-Hämoglobin.
Die Messung der Enzymaktivität mit unterschiedlichen Substratkonzentrationen von 5 - 800 µg LDL/Test ergab ein Optimum bei einer Konzentration von 200 µg LDL-Protein je Test (Abb. 5a und b), die, wenn nicht anders angegeben, bei den Analysen eingesetzt wurde. Der Test zeigte Linearität während einer Inkubationszeit von 30 - 120 Min. (Abb. 6). Alle Versuche wurden mit einstündiger Inkubation bei 37 ^{o}C durchgeführt. Der Test war linear mit 10 - 40 µg Zellprotein/Test (Abb. 7). Für die Untersuchungen wurden 20 µg Protein des Zellhomogenates je Test gewählt.
Nach 60 Min. Inkubation bei 37 ^{o}C wurde die Reaktion durch Zugabe von 0,225 ml eiskalter 50 % Trichloressigsäure (w/v) je Test gestoppt. Die Proben wurden bei 4 ^{o}C mit 8000xg 30 Min. zentrifugiert (Eppendorf-Zentrifuge). Um Verfälschungen der Meßergebnisse durch freies ^{125}J zu verhindern, wurden je 0,5 ml des Überstandes mit 0,005 ml Kaliumjodid und 0,025 ml Wasserstoffperoxid versetzt. Durch H_2O_2 wurde das

freie ^{125}J oxidiert und anschließend mittels Chloroform als J_2 extrahiert (5). Die Proben wurden dann 10 Min. mit 3000xg zentrifugiert. In dem Überstand wurde die Konzentration der durch Trichloressigsäure nicht präzipitierbaren Spaltpeptide bzw. des ^{125}J-Tyrosinüberstandes anhand ihrer Radioaktivität bestimmt. Diese diente als Maß für die Cathepsin D-Aktivität, welche in ng abgebautem LDL-Protein/µg DNS nach 60 Min. angegeben wurde.
Je Meßpunkt wurden 3 getrennte Proben untersucht. Leerwertproben, die anstelle des Zellhomogenates PBS enthielten, wurden jeweils parallel zu den Analysen bestimmt.

Unter den genannten Testbedingungen wurde durch Pepstatin (60 µmol/l), einem spezifischen Cathepsin D-Inhibitor, die Enzymaktivität um 84 % gehemmt.

Abb. 4

Bestimmung der Cathepsin D-Aktivität unter Verwendung von ^{125}J-LDL-Protein als Substrat in 0,5 ml Inkubationsvolumen

1 M Natriumcitrat-HCl-Puffer pH 3,5
200 µg ^{125}J-LDL-Protein
20 µg Zellprotein
60 Min.; 37 °C

↓

50 % TCA; 10 Min.; 0 °C

↓

8000xg, 30 Min.; 4 °C

↓

J_2-Extraktion: KJ 40 %, H_2O_2 30 %, CH_3Cl
3000xg, 10 Min.; 4 °C

↓

^{125}J-Tyrosin im Überstand
ng abgebautes LDL-Protein/µg DNS

Abb. 5a

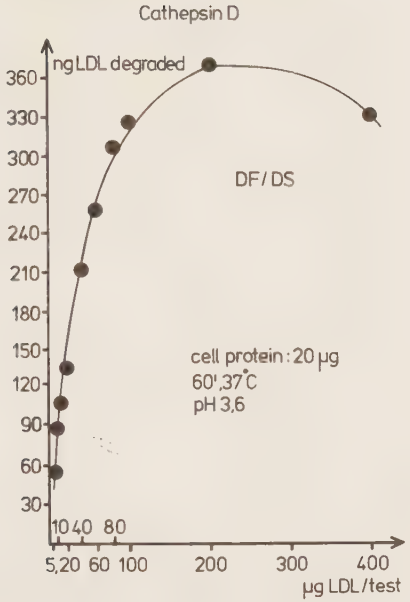

Abb. 5b

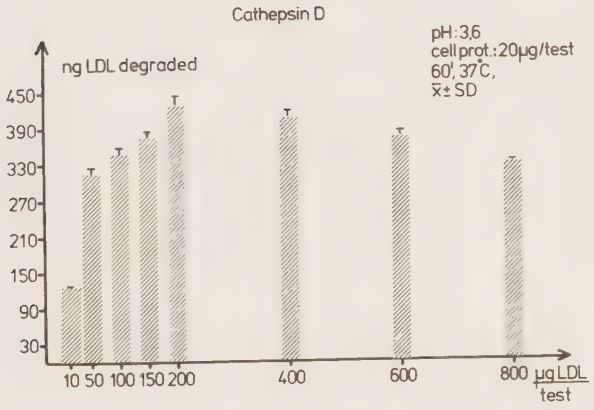

Abb. 5a + b

Cathepsin D-Aktivität (ng LDL-Proteinabbau/20 µg Zellprotein · 60 min^{-1}) in gezüchteten menschlichen Fibroblasten in Abhängigkeit von der Substratkonzentration (^{125}J-LDL-Protein).

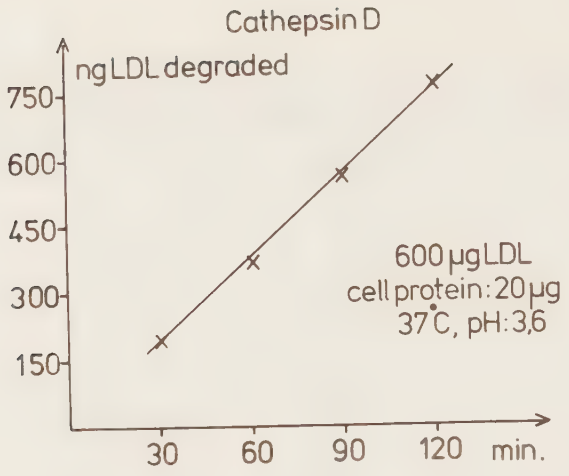

Abb. 6

Cathepsin D-Aktivität (ng LDL-Proteinabbau/20 µg Zellprotein; Substratkonzentration: 600 µg ^{125}J-LDL/Test) in gezüchteten menschlichen Fibroblasten in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer.

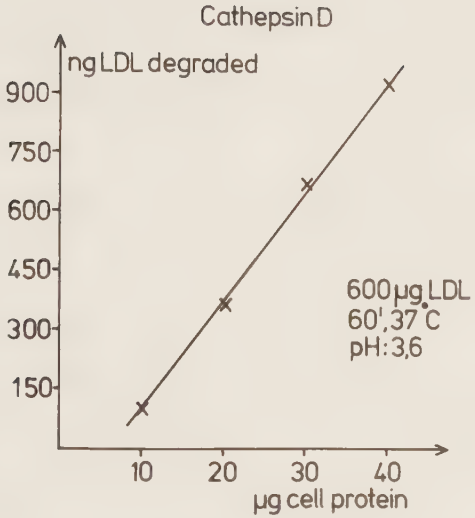

Abb. 7

Cathepsin D-Aktivität (ng LDL-Proteinabbau/60 Min.; Substratkonzentration: 600 µg ^{125}J-LDL/Test) in gezüchteten menschlichen Fibroblasten in Abhängigkeit von der Zellproteinkonzentration.

2.6 Bestimmung der Cathepsin B-Aktivität

Ein Maß für die Cathepsin B-Aktivität ist die aus dem angebotenem Substrat N-Alpha-Benzoyl-DL-Arginin-ß-Naphtylamid freigesetzte Menge an ß-Naphthylamin (3). Die Konzentration dieses Spaltproduktes wurde photometrisch bei 520 nm bestimmt.
2 ml Inkubationslösung mit 0,2 M Phosphatpuffer pH 5,5, 1,33 mM Na_2-EDTA, 0,5 mM Dithiothreitol, 0,15 % Äthanol (v/v) und 40 µg Zellprotein wurden 5 Min. bei 37 °C vorinkubiert. Danach wurde 0,1 mM (= 50 µl) Substrat zugefügt und 20 Min. bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde anschließend durch Zugabe von 2 ml Barretschem Farbreagenz (3) gestoppt. Die Konzentration des enzymatisch freigesetzten ß-Naphthylamin wurde nach 10 Min. durch Messung gegen einen Leerwert, der anstatt Zellprotein PBS enthielt, bestimmt. Die Auswertung der Meßwerte erfolgte anhand einer Eichkurve, die mit 5 verschiedenen Konzentrationen von ß-Naphthylamin als Standard erstellt wurde. Für jeden Meßpunkt wurden 2 getrennte Proben untersucht. Die Enzymaktivität wurde in pkatal (= 1 pmol Substrat/sec) pro µg DNS angegeben.

Leupeptin, ein spezifischer Cathepsin B-Inhibitor, wurde dem oben beschriebenen Testsystem zugesetzt (2 mmol/l) und hemmte die Enzymaktivität um 42 %.

Abb. 8

Bestimmung der Cathepsin B-Aktivität in 2,05 ml Inkubationsvolumen

0,5 mM Dithiothreitol in 0,2 M Phosphatpuffer pH 5,5
1,33 mM Na_2-EDTA in 0,2 M Phosphatpuffer pH 5,5
0,15 % Äthanol
40 µg Zellprotein
Vorinkubation 5 Min., 37 °C

↓

0,1 mM N-Alpha-Benzoyl-DL-Arginin-ß-Naphtylamid
20 Min., 37 °C

↓

2 ml Barretsches Farbreagenz
10 Min., Raumtemperatur

↓

ß-Naphthylamin (520 nm gegen Leerwert)

↓

pkatal/µg DNS

2.7 Bestimmung der Aminopeptidasen-Aktivität

Aminopeptidasen setzen durch Hydrolyse aus dem Substrat Leucin-p-Nitroanilid das gelbgefärbte p-Nitranilin frei, dessen Konzentration ein Maß für die Enzymaktivität ist (31).

Das Inkubationssystem enthielt in einem Gesamtvolumen von 0,7 ml/Test 2,5 mM Substrat gelöst in 0,1 M Borat-Citrat-Phosphat-HCl-Puffer mit 5 % Dimethylformamid (v/v) und 10 µg Zellprotein.

Die Proben wurden 60 Min. bei 37 ^{o}C inkubiert. Durch Zugabe von 0,3 ml 8 % eiskalter Trichloressigsäure (w/v) je Test wurde die Reaktion unterbrochen. Nach 5 Min. Zentrifugation mit 8000xg wurde der Überstand bei 405 nm gegen Aqua dest. gemessen. Zu jeder Analyse wurde ein Leerwert bestimmt, in dem bereits vor der einstündigen Inkubation das Enzym durch Zugabe von Trichloressigsäure ausgefällt wurde. Je Meßpunkt wurden 2 getrennte Proben untersucht. Mit Hilfe des Extinktionskoeffizienten für p-Nitranilin wurde die Aminopeptidasen-Aktivität berechnet und als pkatal/µg DNS angegeben.

Abb. 9

Bestimmung der Aminopeptidasen-Aktivität in 0,7 ml Inkubationsvolumen

0,1 M Borat-Citrat-Phosphat-HCl-Puffer pH 7,8
5 % Dimethylformamid
2,5 mM Leucin-p-nitroanilid
10 µg Zellprotein (Blindprobe: vorherige Zugabe von 0,3 ml 8 % TCA; 0 °C)

60 Min., 37 °C

↓

0,3 ml 8 % TCA; 0 °C
8000xg, 5 Min.; 4 °C

↓

p-Nitranilin (405 nm gegen Aqua dest.)

↓

pkatal/µg DNS

3. Ergebnisse

3.1 Effekte von Hypercholesterinämikerseren auf Proteasenaktivitäten in Fibroblasten von Patienten mit verschiedenen Formen familiärer Hyperlipoproteinämien und von Stoffwechselgesunden

Cathepsin D

Die Cathepsin D-Aktivität/µg DNS, gemessen am Hämoglobin-Abbau war in den Hyperlipämikerfibroblasten serumunabhängig im Paarvergleich zu parallel unter gleichen Bedingungen untersuchten Fibroblasten Stoffwechselgesunder in unterschiedlichem Ausmaß vermindert (Tab. 6, Abb. 10) in Fibroblasten von 3 Patienten mit familiärer Hypertriglyceridämie um durchschnittlich 16 - 19 %, von 4 Patienten mit familiärer Hyper-β-Lipoproteinämie um durchschnittlich 14 - 20 % und von 2 Patienten mit familiärer Hyperlipoproteinämie von Typ III nach Fredrickson von durchschnittlich 6 - 8 %.

In allen 18 Fibroblastenlinien stieg die Cathepsin D-Aktivität unabhängig vom jeweiligen Serum mit zunehmender Zelldichte im Bereich von 12 - 20 µg DNS/78,5 cm^2 linear an (Abb. 10).

Drei Mischseren von Patienten mit primärer Hypercholesterinämie (HS) erniedrigten signifikant im Vergleich zu einem Mischserum Stoffwechselgesunder (NS) die Cathepsin D-Aktivität/µg DNS in Fibroblasten von 2 Patienten mit Typ III-Hyperlipoproteinämie nach Fredrickson um durchschnittlich 25 %, von 3 Patienten mit familiärer Hypertriglyceridämie im Mittel um 30 %, von 4 Patienten mit familiärer Hyper-β-Lipoproteinämie um durchschnittlich 31 % und von 9 Stoffwechselgesunden im Durchschnitt um 26 % (Tab. 6).

Ein vergleichbarer Effekt von HS war auch beim Abbau von LDL-Protein nachweisbar. 4 HS verminderten signifikant im Vergleich zu 4 NS die Cathepsin D-Aktivität pro µg DNS in Fibroblasten von 2 Patienten mit familiärer Hyper-ß-Cholesterinämie um durchschnittlich 15 %, von einem Patienten mit familiärer Hyperlipoproteinämie vom Typ III nach Fredrickson um 38 %, von einem Patienten mit familiärer Hypertriglyceridämie um 15 %, von einem Patienten mit familiärer Hyper-α-Lipoproteinämie um 22 % und von 7 Stoffwechselgesunden um durchschnittlich 22 % (Tab. 7).

Die Verminderung der Cathepsin D-Aktivität war nicht nur bei Einsatz von 200 µg LDL-Protein/Test nachweisbar, sondern auch bei 20, 10 und 5 µg LDL-Protein/Test (Tab. 8).

Die extrazelluläre Cathepsin D-Aktivität in DME + 10 % NS bzw. HS betrug im Durchschnitt 27 - 41 % der intrazellulären Enzymaktivität. Hierbei unterschieden sich NS und HS nicht in ihrer Enzymaktivität (Tab. 9). 24 Std. nach dem letzten Wechsel des Inkubationsmediums fand sich keine zusätzliche, von den Fibroblasten abgegebene Cathepsin D-Aktivität (Tab. 9).

Cathepsin B

Die Cathepsin B-Aktivität/µg DNS war in allen Hyperlipämikerfibroblasten im Paarvergleich zu parallel unter gleichen Bedingungen untersuchten Fibroblasten Stoffwechselgesunder um durchschnittlich 10 - 14 % erniedrigt (Tab. 6, Abb. 11).

In allen 18 Fibroblastenlinien stieg die Cathepsin B-Aktivität im Bereich von 12 - 20 µg DNS/78,5 cm^2 unabhängig vom Serumtyp mit zunehmender Zelldichte linear an (Abb. 11).

Durch 3 HS wurde die Cathepsin B-Aktivität/µg DNS in allen Fibroblastenlinien im Vergleich zum NS nicht verändert (Tab. 6).

Eine Cathepsin B-Aktivität war weder im NS noch in HS nachweisbar (Tab. 9).

Aminopeptidasen

Die Hyperlipämikerfibroblasten unterschieden sich in ihrer Aminopeptidasen-Aktivität/µg DNS nicht von unter parallelen Bedingungen untersuchten Fibroblasten Stoffwechselgesunder (Tab. 6).

Die Aminopeptidasen-Aktivität stieg in allen Zellinien im Bereich von 12 - 20 µg DNS/78,5 cm^2 mit zunehmender Zelldichte linear an (Abb. 12).

Durch 3 HS wurde die Aminopeptidasen-Aktivität/µg DNS in allen Fibroblastenlinien im Vergleich zum NS nicht verändert (Tab. 6).

Die extrazelluläre Aminopeptidasen-Aktivität betrug in DMS + 10 % NS bzw. HS durchschnittlich 23 % der intrazellulären Enzymaktivität. 24 Std. nach dem letzten Wechsel des Inkubationsmediums stieg die extrazelluläre Aminopeptidasen-Aktivität bei allen Fibroblastenlinien um durchschnittlich 9 - 14 % der Ausgangsaktivität im Inkubationsmedium an. Ein serumspezifischer Unterschied konnte nicht festgestellt werden (Tab. 9).

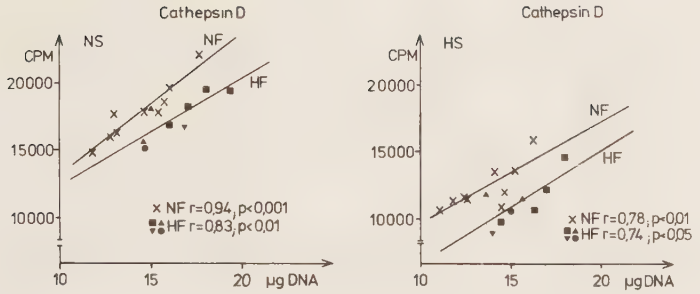

Abb. 10 a + b

Korrelation der Cathepsin D-Aktivität zum DNS-Gehalt (Bereich: 10 - 20 µg DNS) von Fibroblasten, gezüchtet mit Normalserum (NS) bzw. Hypercholesterinämikerserum (HS), von 9 Stoffwechselgesunden (NF: x) und 8 Patienten mit verschiedenen Formen familiärer Hyperlipoproteinämien (HF)

a) yNF=1055x + 2657, yHF=803x + 4346
b) yNF=772x + 1912, yHF=838x - 1720

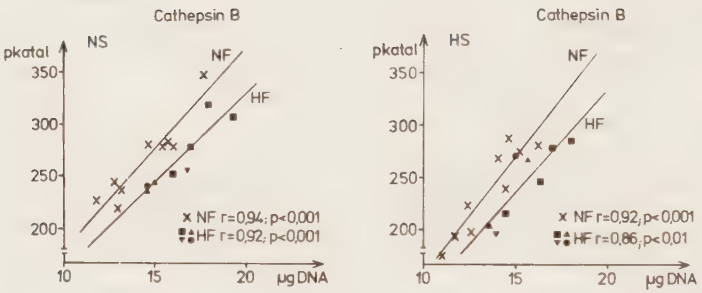

Abb. 11 a + b

Korrelation der Cathepsin B-Aktivität zum DNS-Gehalt (Bereich: 10 - 20 µg DNS) von Fibroblasten, gezüchtet mit Normalserum (NS) bzw. Hypercholesterinämikerserum (HS) von 9 Stoffwechselgesunden (NF: x) und 8 Patienten mit verschiedenen Formen familiärer Hyperlipoproteinämien (HF)

a) yNF=19,5x - 16, yHF=16,9x - 10
b) yNF=22,7x - 70, yHF=19,8x - 62

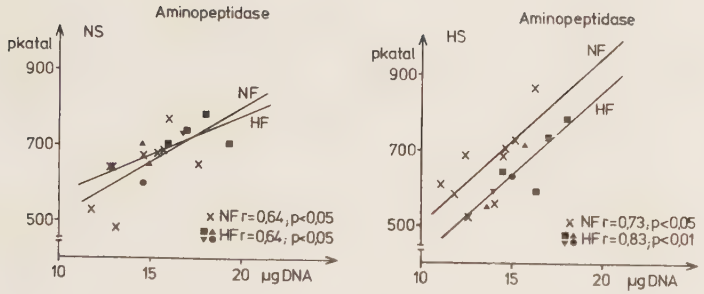

Abb. 12 a + b

Korrelation der Aminopeptidasen-Aktivität zum DNS-Gehalt (Bereich: 10 - 20 µg DNS) von Fibroblasten, gezüchtet mit Normalserum (NS) bzw. Hypercholesterinämikerserum (HS), von 9 Stoffwechselgesunden (NF:x) und 8 Patienten mit verschiedenen Formen familiärer Hyperlipoproteinämien (HF)

a) yNF=29x + 224, yHF=21x + 357
b) yNF=44,5x + 58, yHF=44x + 32

Tabelle 6

Effekt des Serums von Patienten mit primärer Hypercholesterinämie (HS) (n=3) und von Stoffwechselgesunden (NS) (n=1) auf die Aktivität von Cathepsin D (CPM/µg DNS nach 60 Min.), Cathepsin B (pkatal/µg DNS) und Aminopeptidase (pkatal/µg DNS) in Fibroblasten von 9 Stoffwechselgesunden (NF) (Zelldichte: 14,0±0,6 µg DNS/78,5 cm^2), von 2 Patienten mit familiärer Hypercholesterinämie und Hypertriglyceridämie (Typ III nach Fredrickson (Typ III-F), (Zelldichte: 14,5±0,8 µg DNS/78,5 cm^2), von 3 Patienten mit familiärer Hypertriglyceridämie (HTg-F) (Zelldichte: 21,3±4,3 µg DNS/78,5 cm^2) und von 4 Patienten mit familiärer Hyper-α-Lipoproteinämie (HαCH-F) (Zelldichte: 17,0±0,7 µg DNS/78,5 cm^2)

Mittelwert ± SEM; + $p<0,001$; ++ $p<0,025$ (NS/HS)

		NS	HS
Cathepsin D	NF	1242 ± 20	914 ± 26^{+}
	Typ III-F	1143 ± 66	857 ± 57^{++}
	HTg-F	1045 ± 27	736 ± 17^{+}
	HαCH-F	1060 ± 19	728 ± 31^{+}
Cathepsin B	NF	18,4 ± 0,3	17,6 ± 0,5
	Typ III-F	16,3 ± 0	15,9 ± 1,0
	HTg-F	15,4 ± 0,6	15,5 ± 1,2
	HαCH-F	16,4 ± 0,5	15,5 ± 0,3
Aminopeptidase	NF	44,5 ± 1,6	48,9 ± 1,8
	Typ III-F	45,8 ± 2,4	42,7 ± 2,6
	HTg-F	42,0 ± 0,8	41,9 ± 0,3
	HαCH-F	41,8 ± 1,7	41,8 ± 1,6

Tabelle 7

Cathepsin D-Aktivität (ng LDL-Abbau/µg DNS nach 60 Min.) in konfluenten Fibroblastenkulturen von 7 Stoffwechselgesunden (NF) (Zelldichte: 14,0±1,4 µg DNS/78,5 cm^2), von 4 Patienten mit familiärer Hyper-ß-Cholesterinämie (HCH-F) (Zelldichte: 25±4,2 µg DNS/78,5 cm^2), von einem Patienten mit familiärer Hyperlipoproteinämie Typ III nach Fredrickson (Typ III-F) (Zelldichte: 8,4 µg DNS/78,5 cm^2), von einem Patienten mit familiärer Hypertriglyceridämie (HTg-F) (Zelldichte: 13,3 µg DNS/78,5 cm^2) und von einem Patienten mit familiärer Hpyer-α-Lipoproteinämie (HαCH-F) (Zelldichte: 13,5 µg DNS/78,5 cm^2) gezüchtet in je 7 ml DME + 10 % Serum/Platte von Stoffwechselgesunden (NS; n=4) bzw. von Patienten mit primärer Hyper-ß-Cholesterinämie (HS; n=4)

Mittelwert ± SEM;+p < 0,001; ++ p<0,01 (NS/HS)

	NS (ng LDL/µg DNS)	HS (ng LDL/µg DNS)
NF	348 ± 6	270 ± 11^{+}
HCH-F	335 ± 7	284 ± 10^{++}
Typ III-F	255 ± 3	158 ± 6^{+}
HTg-F	285 ± 2	241 ± 7^{++}
HαCH-F	233 ± 2	182 ± 4^{+}

Tabelle 8

Effekt eines Serums von Patienten mit primärer Hypercholesterinämie (HS) und eines von Stoffwechselgesunden auf die Aktivität von Cathepsin D (ng LDL-Abbau/µg DNS nach 60 Min.; Substratkonzentrationen von 5 - 200 µg ^{125}J-LDL-Protein/Test) in Fibroblasten eines Stoffwechselgesunden (Zelldichte: 13,9 ± 3,9 µg DNS/78,5 cm^2)

^{125}J-LDL (µg/Test)	ng LDL-Abbau/µg DNS		Aktivitätsminderung durch HS
	NS	HS	
200	361	224	- 38 %
20	162	94	- 42 %
10	123	82	- 33 %
5	93	59	- 36 %

Tabelle 9

Extra- und intrazelluläre Aktivität von Cathepsin D (CPM/78,5 cm^2; Substrat: ^{14}C-Hämoglobin), Cathepsin B (pkatal/78,5 cm^2) und Aminopeptidasen (pkatal/78,5 cm^2) in Fibroblasten von 9 Stoffwechselgesunden (NF) (Zelldichte: 14,0± 0,6 µg DNS/78,5 cm^2) und von 9 Patienten mit verschiedenen Formen familiärer Hyperlipoproteinämien (HF: 2 Patienten mit familiärer Hypercholesterinämie und Hypertriglyceridämie Typ III nach Fredrickson, 3 Patienten mit familiärer Hypertriglyceridämie und 4 Patienten mit familiärer Hyper-α-Lipoproteinämie (Zelldichte: 17,9±1,5 µg DNS/78,5 cm^2) gezüchtet in je 7 ml DME + 10 % Serum/78,5 cm^2 von Stoffwechselgesunden (NS) (n=1) bzw. von Hypercholesterinämikern (HS) (n=3)

Mittelwert ± SEM; + $p < 0{,}001$ (NS/HS)

		NS	HS
Cathepsin D	DME + 10 % Serum	4833 ± 45	5075 ± 36
	NF extrazellulär	5042 ± 52	5220 ± 82
	NF intrazellulär	17908 ± 955	12386 ± 763+
	HF extrazellulär	4946 ± 51	5223 ± 86
	HF intrazellulär	17592 ± 729	11740 ± 645+
Cathepsin B	10 % Serum	0	0
	NF intrazellulär	266 ± 13	267 ± 1
	HF intrazellulär	240 ± 4	244 ± 13
Aminopeptidase	DME + 10 % Serum	156 ± 1	152 ± 1
	NF extrazellulär	171 ± 1	175 ± 1
	NF intrazellulär	640 ± 28	663 ± 35
	HF extrazellulär	170 ± 1	169 ± 1
	HF intrazellulär	704 ± 18	655 ± 27

3.2 Effekte des Serums von nicht insulinbedürftigen Diabetikern mit schlechter Stoffwechseleinstellung auf Proteasenaktivitäten in Fibroblasten pankreatektomierter Diabetiker und Stoffwechselgesunder

Cathepsin D

Zwei Mischseren von Diabetikern mit schlechter Stoffwechseleinstellung (DS^-) senkten signifikant im Vergleich zu 2 NS die Cathepsin D-Aktivität/µg DNS, gemessen am Hämoglobin-Abbau, in Fibroblasten von 6 pankreatektomierten Diabetikern durchschnittlich um 28 % und von 6 Stoffwechselgesunden im Mittel um ebenfalls 28 % (Tab. 10).

Ein vergleichbarer Effekt von DS^- war auch beim Abbau von LDL-Protein festzustellen. Zwei DS^- senkten signifikant im Vergleich zu zwei NS die Cathepsin D-Aktivität/µg DNS in Fibroblasten von 4 pankreatektomierten Diabetikern um durchschnittlich 26 % und von 4 Stoffwechselgesunden um durchschnittlich 27 % (Tab. 11).

Dieser DS^-Effekt auf den LDL-Proteinabbau durch Cathepsin D ist bei einer Substratkonzentration von 20 µg LDL-Protein/Test ebenso wirksam wie bei 200 µg LDL-Protein/Test (Tab. 12).

Die extrazelluläre Cathepsin D-Aktivität in DME + 10 % NS bzw. DS^- betrug im Durchschnitt 20 - 37 % der intrazellulären Enzymaktivität, wobei keine serumspezifischen Unterschiede nachweisbar waren (Tab. 13). 24 Std. nach dem letzten Wechsel des Inkubationsmediums fand sich keine zusätzliche, von den Fibroblasten abgegebene Cathepsin D-Aktivität (Tab. 13).

In DS^- oder NS gezüchtete Fibroblasten pankreatektomierter Diabetiker unterschieden sich nicht in ihrer

Cathepsin D-Aktivität von 4 Fibroblasten Stoffwechselgesunder, die unter gleichen Bedingungen gezüchtet worden sind.

Cathepsin B

In allen 12 Fibroblastenlinien wurde die Cathepsin B-Aktivität/µg DNS durch 2 DS^- im Vergleich zu 2 NS nicht verändert (Tab. 10).

Eine Cathepsin B-Aktivität war weder in NS noch in DS^- nachweisbar.

Die Fibroblasten der pankreatektomierten Diabetiker unterschieden sich in ihrer Cathepsin B-Aktivität/µg DNS nicht von unter gleichen Bedingungen untersuchten Fibroblasten Stoffwechselgesunder (Tab. 10).

Aminopeptidasen

Zwei DS^- erhöhten im Vergleich zu 2 NS signifikant die Aminopeptidasen-Aktivität/µg DNS in Fibroblasten von 6 pankreatektomierten Diabetikern im Mittel um 35 % und von 6 Stoffwechselgesunden um durchschnittlich 14 % (Tab. 10).

Die extrazelluläre Aminopeptidasen-Aktivität im DME + 10 % NS bzw. DS^- betrug durchschnittlich 14 - 25 % der intrazellulären Enzymaktivität. 24 Std. nach dem letzten Wechsel des Inkubationsmediums stieg die extrazelluläre Aminopeptidasen-Aktivität signifikant um 10 - 15 % an (Tab. 14). Ein serumspezifischer Unterschied konnte nicht festgestellt werden.

Die Fibroblasten pankreatektomierter Diabetiker unterschieden sich in ihrer Aminopeptidasen-Aktivität/µg DNS nicht von unter gleichen Bedingungen untersuchten Fibroblasten Stoffwechselgesunder (Tab. 10).

Tabelle 10

Effekt des Serums von Diabetikern mit schlechter Stoffwechseleinstellung (DS^-) (n=2) und von Stoffwechselgesunden (NS) (n=2) auf die Aktivität von Cathepsin D (CPM/µg DNS nach 60 Min.; Substrat: ^{14}C-Hämoglobin), Cathepsin B (pkatal/µg DNS) und Aminopeptidasen (pkatal/µg DNS) in Fibroblasten von 6 Stoffwechselgesunden (NF) (Zelldichte: 15,5±1,0 µg DNS/78,5 cm^2) und von 6 pankreatektomierten Diabetikern (s.DF) (Zelldichte: 22,5±0,7 µg DNS/78,5 cm^2)

Mittelwert ± SEM; + $p<0,001$ (NS/DS^-)

		NS	DS^-
Cathepsin D	NF	1348 ± 42	972 ± 31$^+$
	s.DF	1406 ± 29	1007 ± 17$^+$
Cathepsin B	NF	15,3 ± 0,6	14,9 ± 0,4
	s.DF	14,3 ± 0,2	14,4 ± 0,5
Aminopeptidase	NF	45,9 ± 1,6	52,2 ± 1,8$^+$
	s.DF	37,1 ± 0,9	49,9 ± 2,0$^+$

Tabelle 11

Effekt des Serums von Diabetikern mit schlechter Stoffwechseleinstellung (DS^-) (n=2) und von Stoffwechselgesunden (NS) (n=2) auf die Aktivität von Cathepsin D (ng LDL-Abbau/µg DNS nach 60 Min.) in Fibroblasten von 4 Stoffwechselgesunden (NF) (Zelldichte: 15,0±1,2 µg DNS/78,5 cm^2) und von 4 pankreatektomierten Diabetikern (s.DF) (Zelldichte: 20,3±4,2 µg DNS/78,5 cm^2).

Mittelwert ± SEM; + $p<0,001$; ++ $p<0,01$ (NS/DS^-)

	NS (ng LDL/µg DNS)	DS^- (ng LDL/µg DNS)
NF	283 ± 23	$204 \pm 19^+$
s.DF	292 ± 30	$221 \pm 37^{++}$

Tabelle 12

Effekt eines Serums von Diabetikern mit schlechter Stoffwechseleinstellung (DS^-) und eines Serums von Stoffwechselgesunden (NS) auf die Aktivität von Cathepsin D (ng LDL-Abbau/µg DNS nach 60 Min.; Substratkonzentration: 20 bzw. 200 µg ^{125}J-LDL-Protein/Test) in Fibroblasten eines Diabetikers (Zelldichte: 13,8±1,0 µg DNS/78,5 cm^2).

^{125}J-LDL (µg/Test)	(ng LDL-Abbau/µg DNS) NS	DS^-	Aktivitätsminderung durch DS^-
200	310	165	- 47 %
20	140	65	- 54 %

Tabelle 13

Extra- und intrazelluläre Cathepsin D-Aktivität (CPM/78,5 cm^2 nach 60 Min.; Substrat: ^{14}C-Hämoglobin in Fibroblastenkulturen von 6 Stoffwechselgesunden (NF) (Zelldichte: 15,5±1,0 µg DNS/78,5 cm^2) und von 6 pankreatektomierten Diabetikern (s.DF) (Zelldichte: 22,5±0,7 µg DNS/78,5 cm^2) gezüchtet in 7 ml DME + 10 % Serum/78,5 cm^2 von Stoffwechselgesunden (NS) (n=2) bzw. von Diabetikern mit schlechter Stoffwechseleinstellung (DS^-) (n=2)

Mittelwert ± SEM; + $p<0,05$; ++ $p<0,001$ (NS/DS^-)

	NS CPM/78,5 cm^2	DS^- CPM/78,5 cm^2
DME + 10 % Serum	5976 ± 126	6090 ± 62
NF extrazellulär	6019 ± 45	6133 ± 104
intrazellulär	19172 ±1639	16625 ±1320$^+$
s.DF extrazellulär	6029 ± 46	6116 ± 55
intrazellulär	30453 ±1046	23438 ± 842^{++}

Tabelle 14

Extra- und intrazelluläre Aminopeptidasen-Aktivität (pkatal/78,5 cm^2) in Fibroblastenkulturen von 6 Stoffwechselgesunden (NF) (Zelldichte: 15,5±1,0 g DNS/78,5 cm^2) und von 6 pankreatektomierten Diabetikern (s.DF) (Zelldichte: 22,5± 0,7 g DNS/78,5 cm^2) gezüchtet in je 7 ml DME + 10 % Serum/78,5 cm^2 von Stoffwechselgesunden (NS) (n=2) bzw. von Diabetikern mit schlechter Stoffwechseleinstellung (DS^-) (n=2)

Mittelwert ± SEM; + $p<0,001$; ++ $p<0,01$ (NS/DS^-)

		NS	DS^-
DME + 10 % Serum		156 ± 1	158 ± 1
NF	extrazellulär	168 ± 1	175 ± 1^+
	intrazellulär	630 ± 60	888 ± 67 $^{++}$
s.DF	extrazellulär	171 ± 1	182 ± 1^+
	intrazellulär	806 ± 40	1166 ± 74^+

3.3 Effekte des Serums von nicht insulinbedürftigen Diabetikern mit guter Stoffwechseleinstellung auf Proteasenaktivitäten in Diabetikerfibroblasten

Cathepsin D

5 Mischseren von Diabetikern mit guter Stoffwechseleinstellung (DS^+) unterschieden sich nicht von 3 NS in ihrer Wirkung auf die Cathepsin D-Aktivität/µg DNS in Fibroblasten von 5 Diabetikern (Tab. 15). In diesen Fibroblasten war jedoch die Wirkung der 5 DS^+ auf die Cathepsin D-Aktivität/µg DNS im Vergleich zu 3 DS^- um durchschnittlich 28 - 33 % erhöht (Tab. 15).

Cathepsin B

5 DS^+, 3 DS^- und 3 NS unterschieden sich nicht in ihrer Wirkung auf die Cathepsin B-Aktivität/µg DNS in den Diabetikerfibroblasten (Tab. 15).

Aminopeptidasen

Zwischen 5 DS^+ und 3 NS war kein Unterschied in Bezug auf die Aminopeptidasen-Aktivität/µg DNS in den Diabetikerfibroblasten feststellbar (Tab. 15). In diesen Fibroblasten war die Wirkung der 5 DS^+ auf die Aminopeptidasen-Aktivität/µg DNS im Vergleich zu 3 DS^- um durchschnittlich 9 % vermindert (Tab. 15).

Tabelle 15

Effekt des Serums von Diabetikern mit guter Stoffwechseleinstellung (DS^+) (n=5), von Diabetikern mit schlechter Stoffwechseleinstellung (DS^-) (n=3) und von Stoffwechselgesunden (NS) (n=3) auf die Aktivität von Cathepsin D (ng LDL-Abbau/µg DNS nach 60 Min.), Cathepsin B (pkatal/µg DNS) und Aminopeptidasen (pkatal/µg DNS) in Fibroblasten von 5 Diabetikern (Zelldichte: 15±0,8 µg DNS/78,5 cm^2)

Mittelwert ± SEM; + $p<0,005$ (NS/DS^-); ++ $p<0,01$ (DS^+/DS^-) +++ $p<0,05$ (NS/DS^-)

	NS	DS	DS^-
Cathepsin D	315 ± 11	298 ± 8	$228 \pm 22^{+/++}$
Cathepsin B	18,6±1,1	20,9±1,1	19,8±1,5
Aminopeptidase	49,0±1,1	51,9±1,7	$56,9 \pm 1,8^{+++}$

3.4 Effekte des Serums von nicht insulinbedürftigen Diabetikern mit schlechter Stoffwechseleinstellung, mit guter Stoffwechseleinstellung, von Hypercholesterinämikern und von Stoffwechselgesunden auf Proteasenaktivitäten in arteriellen glatten Muskelzellen

Cathepsin D

2 DS^- verminderten signifikant im Vergleich zu 2 NS die Cathepsin D-Aktivität/µg DNS in arteriellen glatten Muskelzellen eines Stoffwechselgesunden um durchschnittlich 16 % und im Vergleich zu 2 DS^+ im Mittel um 25 %. 2 HS erniedrigten signifikant im Vergleich zu 2 NS die Cathepsin D-Aktivität/µg DNS in arteriellen glatten Muskelzellen um durchschnittlich 29 % (Tab. 16). NS und DS^+ zeigten keine unterschiedliche Wirkung auf die Cathepsin D-Aktivität/µg DNS in den arteriellen glatten Muskelzellen (Tab. 16).

Die Cathepsin D-Aktivität/µg DNS betrug in den arteriellen glatten Muskelzellen nur 33 % der Enzymaktivität/µg DNS, die in Fibroblasten Stoffwechselgesunder nachweisbar war (Abb. 11).

Cathepsin B

Je 2 NS, DS^+, DS^- und HS wirkten sich nicht unterschiedlich auf die Cathepsin B-Aktivität/µg DNS in arteriellen glatten Muskelzellen eines Stoffwechselgesunden aus (Tab. 16).

Die Cathepsin B-Aktivität/µg DNS betrug in den arteriellen glatten Muskelzellen nur durchschnittlich 17 % der Enzymaktivität/µg DNS, die in Fibroblasten Stoffwechselgesunder nachweisbar war (Abb. 11).

Aminopeptidasen

Je 2 NS, DS^+, DS^- und HS wirkten sich nicht unterschiedlich auf die Aminopeptidasen-Aktivität/µg DNS in arteriellen glatten Muskelzellen eines Stoffwechselgesunden aus (Tab. 16).

Die Aminopeptidasen-Aktivität/µg DNS betrug in arteriellen glatten Muskelzellen durchschnittlich nur 14 % der Enzymaktivität/µg DNS in Fibroblasten Stoffwechselgesunder (Abb. 11).

Tabelle 16

Effekt des Serums von Stoffwechselgesunden (NS) (n=2), von Diabetikern mit guter Stoffwechseleinstellung (DS^+) (n=2), von Diabetikern mit schlechter Stoffwechseleinstellung (DS^-) (n=2) und von Patienten mit primärer Hypercholesterinämie (HS) (n=2) auf die Aktivität von Cathepsin D (ng LDL-Abbau/µg DNS nach 60 Min.), Cathepsin B (pkatal/µg DNS) und Aminopeptidasen (pkatal/µg DNS) in Kulturen arterieller glatter Muskelzellen eines Stoffwechselgesunden (Zelldichte: 52,9±7,0 µg DNS/78,5 cm^2).

Mittelwert ± SEM
+ $p<0,05$ (NS/DS^-); ++ $p<0,05$ (DS^+/DS^-); x $p<0,001$ (NS/HS)

	NS	DS^+	DS^-	HS
Cathepsin D	107 ± 2	120 ± 2	90 ± $9^{+/++}$	76 ± 5^{x}
Cathepsin B	2,7 ± 0,1	2,5 ± 0,1	2,5 ± 0,1	2,5 ± 0,1
Aminopeptidase	6,2 ± 0,5	5,6 ± 0,2	5,7 ± 0,2	5,0 ± 0,5

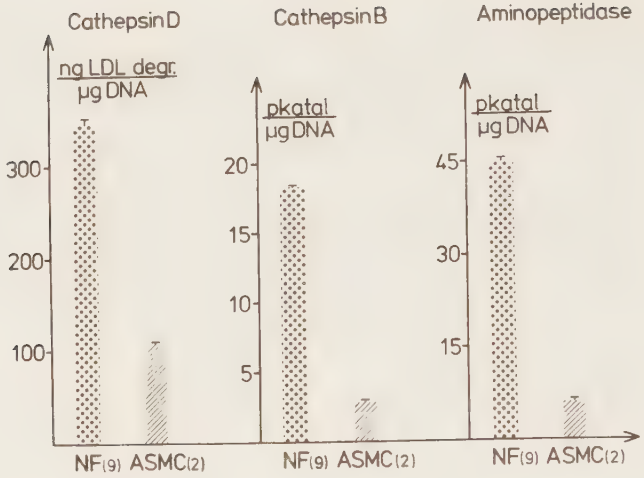

Abb. 11

Cathepsin D-, Cathepsin B- und Aminopeptidasen-Aktivität in Fibroblasten von 9 Stoffwechselgesunden (NF) und in arteriellen glatten Muskelzellen eines Stoffwechselgesunden (ASMC).

(n) = Anzahl der Versuche

I = Mittelwert ± SEM

4. Diskussion

4.1 Zellgebundene Änderungen der Cathepsin D-, Cathepsin B- und der Aminopeptidasen-Aktivität in mesenchymalen Zellen

Von der Düsseldorfer Arbeitsgruppe wurde eine zellfixierte Aktivitätsminderung der Cathepsine D und B in Fibroblasten von Patienten mit familiärer Hyper-ß-Cholesterinämie im Vergleich zu Fibroblasten Stoffwechselgesunder nachgewiesen (37).

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, daß auch bei anderen Formen familiärer Hyperlipoproteinämien (Hyperlipoproteinämie Typ III nach Fredrickson, Hypertriglyceridämie, Hyper-$\mathcal{L}$-Lipoproteinämie), die nicht mit einem LDL-Rezeptordefekt einhergehen, eine serumunabhängige zellgebundene Verminderung der o. g. Proteasenaktivitäten auftritt. Die im Vergleich zu Normalfibroblasten unveränderte Aktivität der extralysosomalen Aminopeptidase in den verschiedenen Hyperlipämikerfibroblasten deutet darauf hin, daß es sich nicht um eine generelle Beeinflussung der Proteasenaktivitäten handelt, sondern um eine gezielte Veränderung lysosomaler Enzyme.

Die Ursache der serumunabhängigen zellgebundenen Aktivitätsminderung der Cathepsie D und B in Hyperlipämikerfibroblasten ist noch ungeklärt. Das Vorliegen eines vom LDL-Rezeptordefekt unabhängigen genetischen Defektes mit verminderter Aktivität der o. g. Enzyme in mesenchymalen Zellen kann zur Zeit nicht ausgeschlossen werden.
Vererbbare zelluläre Defekte anderer lysosomaler Enzyme, die mit einem erhöhten Atheroskleroserisiko

einhergehen sind z. B. bei der Pseudo-Hurler-Dystrophie und der Wolmanschen Krankheit beschrieben worden (28, 36). Bei diesen Erkrankungen tritt infolge eines Mangels an Cholesterinesterase eine intrazelluläre Akkumulation von Cholesterinestern auf.

Im Gegensatz zu den Befunden an Hyperlipämikerfibroblasten waren zellgebundene Veränderungen der Proteasenaktivitäten in Fibroblasten von sekundären Diabetikern nach Pankreatektomie nicht nachweisbar. Diese Befunde stehen in Einklang mit Ergebnissen dieser Arbeitsgruppe an Fibroblasten von Patienten mit familiärem Diabetes mellitus. Daraus geht hervor, daß bei mesenchymalen Zellen von Diabetikern weder angeborene noch erworbene zellulär fixierte Störungen von Cathepsin D, Cathepsin B und Aminopeptidasen vorliegen.

Die Cathepsine D und B gehören zur Gruppe der lysosomalen Enzyme, während die Aminopeptidasen den extralysosomalen Enzymen angehörten. Dies geht aus den unterschiedlichen pH-Optima im in vitro-Test, der Empfindlichkeit gegenüber spezifischen Proteaseninhibitoren wie Pepstatin und Leupeptin sowie zahlreichen Untersuchungen anderer Autoren zur intrazellulären Lokalisation dieser Enzyme hervor (1, 3, 4, 19, 20, 24, 31).

4.2 Einfluß von Hypercholesterinämikerserum auf die Cathepsin D-, Cathepsin B- und die Aminopeptidasen-Aktivität in mesenchymalen Zellen

Bei experimentellen Untersuchungen zu Veränderungen in der Arterienwand von Kaninchen und Ratten mit diätinduzierter Hypercholesterinämie wurde eine verminderte Aktivität der sauren Cholesterinesterase und eine gesteigerte Cholesterinestersynthese nachgewiesen (23, 27, 35). Dies führte zur vermehrten Akkumulation von Cholesterinestern und zum typischen Bild der Atherosklerose.

Untersuchungen über die Wirkung von Hypercholesterinämikerserum (HS) auf die Aktivität von Cathepsin D, Cathepsin B und Aminopeptidasen in menschlichen Fibroblasten wurden bisher nur von der Düsseldorfer Arbeitsgruppe durchgeführt. Dabei wurde eine Verminderung der Cathepsin D-Aktivität durch HS im Vergleich zu NS in Fibroblasten von Patienten mit familiärer Hyper-ß-Cholesterinämie nachgewiesen (37).

Durch die vorliegenden Untersuchungen konnte erstmals belegt werden, daß dieser Effekt von HS auf die Cathepsin D-Aktivität sowohl bei anderen Formen familiärer Hyperlipoproteinämien (Hyperlipoproteinämie Typ III nach Fredrickson, Hypertriglyceridämie, Hyper-α-Lipoproteinämie) als auch bei arteriellen glatten Muskelzellen von Stoffwechselgesunden auftritt. Das Ausmaß der Aktivitätsminderung von Cathepsin D bei Hyperlipämikerfibroblasten ist vergleichbar mit dem bei Normalfibroblasten. Daraus ergibt sich, daß dieser HS-Effekt unabhängig vom Vorliegen anderweitiger zellulär fixierter Veränderungen der Cathepsin D-Aktivität

wirksam wird.
Die Verminderung der Cathepsin D-Aktivität erfolgt offensichtlich nicht substratspezifisch, da sie nicht nur beim Abbau des klassischen Testsubstrates Hämoglobin, sondern auch in qualitativ gleicher Weise beim Abbau der potentiell atherogenen LDL auftritt. Dies ist von Bedeutung, da Cathepsin D als Schlüsselenzym für den LDL-Abbau angesehen wird. Untersuchungen an gezüchteten arteriellen glatten Muskelzellen vom Rind haben gezeigt, daß der intralysosomale Abbau des Apoprotein B von menschlicher LDL von Cathepsin D begonnen wird und anschließend von diesem und anderen Enzymen, wie z. B. Cathepsin B, vervollständigt wird (32).

HS beeinflußt spezifisch die Cathepsin D-Aktivität, da ein anderes lysosomales Enzym, das Cathepsin B, wie auch die extralysosomale Aminopeptidase in ihren Aktivitäten nicht verändert wurden.

Die Messungen der extrazellulären Enzymaktivitäten belegen, daß die verminderte Cathepsin D-Aktivität nicht infolge Abgabe dieses Enzyms durch die Fibroblasten ins extrazelluläre Medium bedingt ist.

In der Literatur sind erhöhte Blutkonzentrationen der Proteaseninhibitoren Alpha-2-Makroglobulin und Alpha-1-Antitrypsin in Beziehung zur verminderten Proteasenaktivität beim Abbau von Basalmembranen gesetzt worden (6). Da die Konzentrationen dieser Proteaseninhibitoren bei den verwendeten Hypercholesterinämikerseren im Normbereich lagen, kann die verminderte Cathepsin D-Aktivität auch nicht durch diese Inhibitoren verursacht worden sein.

Falls die Verminderung der Cathepsin D-Aktivität durch Hypercholesterinämikerseren auch in der Arterienwand von Hyperlipämikern ohne LDL-Rezeptordefekt hervorgerufen wird, könnte die Verzögerung im LDL-Abbau auch zu einer Akkumulation von LDL in der Arterienwand beitragen. Bei Patienten mit verschiedenen Formen familiärer Hyperlipoproteinämien könnte sich ein solcher Serumeffekt mit der beschriebenen zellulär fixierten Verminderung der Cathepsin D-Aktivität kombinieren und damit das atherogene Risiko unabhängig vom LDL-Rezeptordefekt noch weiter erhöhen.

4.3 Serumeffekte in Abhängigkeit von der diabetischen Stoffwechseleinstellung auf die Cathepsin D-, Cathepsin B- und die Aminopeptidasen-Aktivität in mesenchymalen Zellen

Die durch Serum von Diabetikern mit schlechter Stoffwechseleinstellung (DS^-) verminderte Aktivität von Cathepsin D in Fibroblasten und arteriellen glatten Muskelzellen zeigt Parallelen zu in der Literatur beschriebenen Veränderungen anderer lysosomaler Enzyme. Diese Veränderungen sind mit einem erhöhten Risiko für Mikroangiopathien in Zusammenhang gebracht worden (14, 15, 17, 33).
In frisch aus dem Blut isolierten mononukleären Zellen von insulinbedürftigen Diabetikern ist eine verminderte Aktivität der N-Azetyl-ß-Glukosaminidase und der sauren Cholesterinesterase nachgewiesen worden, wobei gleichzeitig der LDL-Proteinabbau vermindert war (14, 15). Eine Aktivitätsminderung verschiedener Glukosidasen ist in Nieren-, Hirn- und Aortenwandgewebe streptozotocindiabetischer Ratten beschrieben worden (17, 33), während in der Leber und im Urin dieser Ratten eine erhöhte Aktivität der N-Azetyl-D-Glukosaminidase und der ß-Galaktosidase nachgewiesen wurde (17).
Die Pathomechanismen der gegensätzlichen Änderungen der Enzymaktivitäten in den verschiedenen Organen sind aber noch weitgehend ungeklärt.

Von der Düsseldorfer Arbeitsgruppe wurde nachgewiesen, daß DS^- im Vergleich zu NS die Cathepsin D-Aktivität vermindert und die Aminopeptidasen-Aktivität in Fibroblasten von Patienten mit familiärem Diabetes mellitus erhöht (37).

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, daß die Erniedrigung der Cathepsin D-Aktivität durch DS^- auch in humanen arteriellen glatten Muskelzellen und in Fibroblasten sekundärer Diabetiker nach Pankreatektomie auftritt. Da dieser DS^--Effekt auf Cathepsin D sowohl beim Abbau von Hämoglobin als auch in qualitativ gleichem Ausmaß beim LDL-Abbau auftritt, liegt ähnlich wie beim HS-Effekt eine substratunspezifische Wirkung von DS^- vor.

Die extrazellulären Messungen der Cathepsin D-Aktivität gaben ebenfalls wie bei den HS-Versuchen keinen Hinweis darauf, daß die verminderte Aktivität dieses Enzyms infolge Abgabe von Cathepsin D durch die Fibroblasten ins extrazelluläre Medium bedingt ist.

Da die Konzentrationen der Proteaseninhibitoren Alpha-2-Makroglobulin und Alpha-1-Antitrypsin in den verwendeten DS^- im Normbereich lagen, kann die verminderte Cathepsin D-Aktivität auch nicht durch diese Inhibitoren erklärt werden.

Die Faktoren im DS^- wirkten in unterschiedlicher Weise sowohl auf lysosomale als auch auf extralysosomale Enzyme. Dies wird deutlich an der erhöhten Aktivität der extralysosomalen Aminopeptidase und der verminderten Aktivität des lysosomalen Cathepsin D, während die Aktivität des ebenfalls lysosomalen Cathepsin B unbeeinflußt blieb.

Die durch DS^- erhöhte Aminopeptidasen-Aktivität in Fibroblasten pankreatektomierter Diabetiker zeigt Parallelität zur stark erhöhten Aminopeptidasen-Aktivität im Skelettmuskel streptozotocindiabetischer Ratten. Dieser Aktivitätsanstieg ist in Zusammenhang

zum gesteigerten Proteinkatabolismus des Skelettmuskels beim Diabetes mellitus gesetzt worden (7, 8).

Weiterhin konnte durch die vorliegenden in vitro-Untersuchungen belegt werden, daß die Wirkung der Faktoren im Serum von Typ II-Diabetikern von der jeweiligen Stoffwechseleinstellung abhängig ist, da die Proteasenaktivitäten in den mesenchymalen Zellen durch eine Optimierung der diabetischen Stoffwechsellage normalisiert wurden. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit parallelen Veränderungen anderer lysosomaler Enzyme in der Arterienwand streptozotocindiabetischer Ratten und in mononukleären Blutzellen von Patienten mit Insulinmangeldiabetes. Hierbei konnten die eingangs erwähnten Enzymaktivitäten sowie der LDL-Abbau durch mehrtägige Insulintherapie wieder normalisiert werden (14, 15, 17, 33). Es blieb ungeklärt, ob es sich dabei um eine direkte Wirkung des Insulins auf diese Enzyme handelt oder um eine indirekte Wirkung über die Verbesserung der diabetischen Stoffwechsellage.
Da in den vorliegenden Untersuchungen die Insulinkonzentrationen in den Diabetikerseren sowohl vor als auch nach Stoffwechselnormalisierung um das 2 - 3fache erhöht waren, spricht dies gegen einen direkten Effekt des Insulins auf die Cathepsin D- und die Aminopeptidasen-Aktivität in mesenchymalen Zellen.

Nachfolgende Untersuchungen der Düsseldorfer Arbeitsgruppe zur weiteren Charakterisierung der proteasenwirksamen Serumfaktoren im DS^- und HS belegen, daß es sich um niedermolekulare Faktoren mit einem Molekulargewicht MG $<$ 12.000 Daltons handelt (unveröffentlichte Ergebnisse). Somit kommen höhermolekulare Substanzen wie z. B. eine erhöhte Lipidkonzentration im Serum als

Faktoren für die verminderte Cathepsin D-Aktivität nicht in Betracht. Demnach scheidet in diesen Seren auch Wachstumshormon (MG: 30.000 Daltons) als potentieller Proteaseninhibitor aus, zumal die STH-Serumspiegel innerhalb des Normbereiches lagen. Damit im Einklang stehen Untersuchungen von Heickendorff und Ledet, die keinen Effekt von humanem Wachstumshormon (1 ng/ml) auf die Cathepsin D-Aktivität in arteriellen glatten Muskelzellen von Kaninchen gefunden haben (persönliche Mitteilung).

Ähnlich wie beim HS-Effekt diskutiert, könnte die vom Ausmaß fast gleiche Wirkung von DS^- zum verminderten LDL-Abbau in der Arterienwand von Diabetikern, damit zur vermehrten Akkumulation von LDL und zur Erhöhung des atherogenen Risikos beim Diabetes mellitus beitragen.

5. Zusammenfassung

Beim Diabetes mellitus sowie bei Hyperlipoproteinämien sind Störungen im Proteinabbau nachgewiesen worden, die mit der Entstehung von Mikro- und Makroangiopathien in Zusammenhang gebracht worden sind.
An Störungen des Proteinstoffwechsels können lysosomale und extralysosomale Enzyme beteiligt sein. Daher wurden Cathepsin D, Cathepsin B und Aminopeptidasen in menschlichen mesenchymalen Zellen untersucht sowie die Wirkung verschiedener Humanseren auf diese Proteasen. Zur Differenzierung zellfixierter und extrazellulärer Faktoren wurden Untersuchungen unter Zellkulturbedingungen durchgeführt.

Es wurden folgende Fragen geprüft:

1. Liegen zellgebundene Veränderungen der Aktivität von Cathepsin D, Cathepsin B und Aminopeptidasen in Fibroblasten von Patienten mit verschiedenen Formen familiärer Hyperlipoproteinämien im Vergleich zu Fibroblasten Stoffwechselgesunder vor?

2. Unterscheiden sich die Effekte des Hypercholesterinämikerserums auf die Cathepsin D-Aktivität in Fibroblasten und arteriellen glatten Muskelzellen bei Verwendung von LDL statt Hämoglobin als Enzymsubstrat?

3.a) Wie beeinflußt Serum von Diabetikern mit schlechter Stoffwechseleinstellung die o. g. Proteasenaktivitäten in Fibroblasten sekundärer Diabetiker nach Pankreatektomie und in arteriellen glatten Muskelzellen Stoffwechselgesunder?

3.b) Wie wirkt sich eine Normalisierung der diabetischen Stoffwechsellage auf diese Serumeffekte aus?

Untersucht wurden Hautfibroblasten von:

1. 11 Patienten mit verschiedenen Formen familiärer Hyperlipoproteinämien (HF) (2 Patienten mit Hyper-ß-Cholesterinämie, 2 Patienten mit Typ III-Hyperlipoproteinämie nach Fredrickson, 3 Patienten mit Hypertriglyceridämie, 4 Patienten mit Hyper-α-Lipoproteinämie),
2. 6 insulinbedürftige pankreatektomierten Diabetikern ohne familiäre Diabetesbelastung (s.DF),
3. 9 Stoffwechselgesunden (NF)

und arterielle glatte Muskelzellen eines Stoffwechselgesunden.

Die Wirkung folgender Seren wurde geprüft:

1. von Patienten mit primärer Hypercholesterinämie (HS) (n=7),
2. von Typ II-Diabetikern mit schlechter Stoffwechseleinstellung (DS^-) (n=7),
3. von Typ II-Diabetikern mit guter Stoffwechseleinstellung (DS^+) (n=5)
4. von Stoffwechselgesunden (NF) (n=6).

Die Zellinien wurden in der 3. - 7. Passage bei 37 ^oC in DME + 10 % Humanserum bis zur Konfluenz gezüchtet. Anschließend wurde im Zellhomogenat die Aktivität von Cathepsin D (Testsubstrat: ^{14}C-Hämoglobin, CPM/µg DNS oder ^{125}J-LDL-Protein, ng LDL-Abbau/µg DNS), Cathepsin B (Testsubstrat: N-Alpha-Benzoyl-DL-Arginin-ß-Naphthylamid, pkatal/µg DNS) und Aminopeptidasen (Testsubstrat:

Leucin-p-nitroanilid, pkatal/ g DNS) bestimmt. Die Aktivität dieser Proteasen wurde ebenfalls im Inkubationsmedium untersucht.

In den HF war im Vergleich zu NF eine zellassoziierte Verminderung der Cathepsin D-Aktivität um 14 - 20 % ($p < 0,0025$) und der Cathepsin B-Aktivität um 10 - 14 % ($p < 0,005$) nachweisbar. Im Gegensatz zur Verminderung der Aktivität lysosomaler Enzyme blieb die Aktivität der extralysosomalen Aminopeptidasen unverändert. Die Verminderung der genannten Enzymaktivitäten könnte Ausdruck eines genetischen Defektes bei familiären Hyperlipoproteinämien sein.
Im Unterschied zu den Befunden bei HF fand sich bei den s.DF keine zellfixierte Änderung der gemessenen Proteasenaktivitäten.

HS erniedrigte im Vergleich zu NS die intrazelluläre Cathepsin D-Aktivität gemessen am ^{14}C-Hämoglobin-Abbau in HF und NF in gleichem Umfang um durchschnittlich 25 - 32 % ($p < 0,025 - 0,001$), gemessen am ^{125}J-LDL-Proteinabbau im Mittel um 15 - 38 % ($p < 0,01 - 0,001$) und in arteriellen glatten Muskelzellen um 29 % ($p < 0,001$).
HS zeigte dagegen keine Wirkung auf die Cathepsin B- und Aminopeptidasen-Aktivität dieser Zellen.

DS^- verminderte im Vergleich zu NS die Cathepson D-Aktivität in s.DF und NF, gemessen am ^{14}C-Hämoglobin-Abbau durchschnittlich um 28 % ($p < 0,001$), gemessen am ^{125}J-LDL-Proteinabbau im Mittel um 24 - 29 % ($p < 0,01 - 0,001$) und in arteriellen glatten Muskelzellen um 16 % ($p < 0,05$). Die Aminopeptidasen-Aktivität wurde durch DS^- in s.DF und NF um durchschnittlich 14 - 34 % ($p < 0,001$) erhöht. In arteriellen glatten Muskelzellen wurde die Aminopeptidasen-Aktivität nicht wesentlich beeinflußt.

DS^+ zeigte im Vergleich zu NS keine unterschiedliche Wirkung auf die gemessenen Proteasenaktivitäten in mesenchymalen Zellen.

Durch die vorliegenden in vitro-Untersuchungen konnte belegt werden, daß die Serumwirkung auf die Proteasenaktivitäten von der jeweiligen Stoffwechseleinstellung der Typ II-Diabetiker abhängig ist.

DS^- und HS enthalten Serumfaktoren, die in der Lage sind, den Proteinstoffwechsel und besonders den LDL-Katabolismus zu vermindern. Eine ähnliche Verminderung des LDL-Abbaus in der Arterienwand könnte zur vermehrten LDL-Ablagerung führen und zur Entwicklung von Angiopathien beim Diabetes mellitus oder bei familiären Hyperlipoproteinämien beitragen. Bei den familiären Hyperlipämikern könnte die Kombination eines solchen Serumeffektes mit dem beschriebenen zellulären Defekt das atherogene Risiko noch weiter erhöhen.

6. Literaturverzeichnis

1. Amenta, J.S., Sargus, M.J., Venkatesan, S., Shinozuka, H.: Role of the vacuolar apparatus in augmented protein degradation in cultured fibroblasts. J. Cell Physiol. 94, 77 (1978)

2. Barill, M.F.: General principles of isolation and detection of mycoplasmas. INSERM 33, 135 (1974)

3. Barret, A.J.: Cathepsin B and other thiol proteinases. In: Proteinases in Mammalian Cells and Tissues, A.J. Barret (edit.), 181 (1977) Elsevier/North-Holland, Biomedical Press

4. Barret, A.J.: Cathepsin D and other carboxyl proteinases. In: Proteinases in Mammalian Cells and Tissues, A.J. Barret (edit.), 210 (1977) Elsevier/North-Holland, Biomedical Press

5. Biermann, E.L., Stein, O.Y.: Lipoprotein uptake and metabolism by rat aortic smooth muscle cells in tissue culture. Circ. Res. 35, 136 (1974)

6. Brownlee, M.: Alpha-2-macroglobulin and reduced basementmembrane degradation in diabetes. Lancet 1, 779 (1976)

7. Dahlmann, B., Reinauer, H., Schroeter, C., Herbertz, L.: Myofibrillar protein degradation and muscle proteinases in normal and diabetic rats. Biochem. Med. 21, 33 (1979)

8. Dahlmann, B., Reinauer, H.: Purification and some properties of an alkaline proteinase from rat skeletal muscle. Biochem. J. 171, 803 (1978)

9. Dulbecco, R., Freeman, G.: Plaque production by the polyoma virus. Virology 8, 396 (1959)

10. Dulbecco, R., Vogt, M.: Plaque formation and isolation of pure lines with poliomyelitis viruses. J. Exp. Med. 99, 167 (1960)

11. Fushimi, H., Tarui, S.: ß-Glucosidases and diabetic microangiopathy. I. Decreases of ß-glucosidase activities in diabetic rat kidney. J. Biochem. 79, 265 (1976)

12. Fushimi, H., Tarui, S.: Kidney and serum ß-N-acetylglucosaminidase activities in streptozotocin diabetes rats and their responses to insulin and glucogon. J. Biochem. 76, 225 (1974)

13. Havel, R.J., Eder, J.A., Bragdon, J.H.: The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. J. Clin. Invest. 34, 1345 (1955)

14. Henze, K., Chait, A.: Insulin treatment of diabetes enhances lysosomal enzyme activity and low density lipoprotein (LDL) degradation by circulating mononuclear cells (MS). Diabetes 29, (Suppl. 2) 11A (1980)

15. Henze, K., Chait, A.: Lysosomal enzyme activities and low densitiy lipoprotein receptors in circulating mononuclear cells. Diabetologia 20, 625 (1981)

16. Hinegardner, R.: An improved fluorometric assay for DNS. Analyt. Biochem. 39, 197 (1971)

17. Juretić D., Lipovac, K., Hadzija, M., Slijepcevic, M.: The activities of glycosidases in diabetic rats. Diabetilogia 15, 243 (1973)

18. Leake, D.S., Peters, T.J.: Proteolytic degradation of low densitiy lipoproteins by arterial smooth muscles cells. The role of individual cathepsins. Biochim. Biophys. Acta 664, 108 (1981)

19. Lie, S.O., Schofield, B.H., Taylor, H.A., Doty, S.B.: Structure and function of the lysosomes of human fibroblasts in culture: Dependence on medium pH. Pediat. Res. 7, 13 (1973)

20. Louvard, D.: Apical membrane aminopeptidase appears at site of cell-cell contact in cultured kidney epithelial cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 4132 (1980)

21. Lowry, O.M., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193, 265 (1951)

22. Mc Farlane, A.S.: Efficient trace-labeling of proteins with iodine. Nature (London) 182, 53 (1978)

23. Peters, T.J., de Duve, C.: Lysosomes of the arterial wall. Part II: Subcellular fractionation of aortic cells isolated from rabbits with experimental atheroma. Exp. Mol. Pathol. 20, 228 (1974)

24. Rome, L.H., Garvin, A.J., Allietta, M.M., Neufeld, E.F.: Two species of lysosomal organells in cultured human fibroblasts. Cell. 17, 143 (1979)

25. Ross, R., Glomset, J.A.: Atherosclerosis and the arterial smooth muscle cell. Science 180 1332 (1973)

26. Roth, J.S., Losty, T., Wiebicki, E.: Assay of proteolytic enzyme activity using a ^{14}C-labeled hemoglobin. Analyt. Biochem. 42, 214 (1971)

27. Shinomiya, M., Matsuoka, N., Shirai, K., Saito, Y., Kumagai, A.: Studies on cholesterol esterase in rat arterial wall. Atherosclerosis 33, 343 (1979)

28. Sloan, H.R., Fredrickson, D.S.: Enzyme deficiency in cholesteryl ester storage disease. J. Clin. Invest. 51, 1923 (1972)

29. Spiro, R.G., Spiro, M.J.: Effect of diabetes on the biosynthesis of the renal glomerular basement membrane. Diabetes 20, 641 (1971)

30. Spiro, R.G., Spiro, M.J.: Studies on the biosynthesis of the hydroxylsinelinked disaccharide unit of basement membranes and collagenes. III: Tissue and subcellular distribution of glycosyltransferases and the effect of verious conditions on the enzyme levels. J. Biol. Chem. 246, 4919 (1971)

31. Wachsmuth, E.D., Fritze, I., Pfleiderer, G.: An aminopeptidase occuring in pig kidney.

I: An improved method of preparation. Physical and enzymic properties. Biochemistry 5, 169 (1966)

32. von der Westhuyzen, D.R., Gevers, W., Coetzee, G.A.: Cathepsin D-dependent initiation of the hydrolysis by lysosomal enzymes of apoprotein B from low density lipoproteins. Eur. J. Biochem. 112, 153 (1980)

33. Wolinsky, H., Goldfischer, S., Capron, L., Capron, F., Coltoff-Schiller, B., Kasak, L.: Hydrolase activities in the rat aorta: I. Effects of diabetes mellitus and insulin treatment. Circ. Res. 42, 821 (1978)

34. Wolinsky, H., Capron, L., Goldfischer, S., Capron, F., Coltoff-Schiller, B., Kasak, L.: Hydrolase activities in the rat aorta: II. Effects of hypertension alone and in combination with diabetes mellitus. Circ. Res. 42, 831 (1978)

35. Wolinsky, H.: A proposal linking clearance of circulating lipoproteins to tissue metabolic activity as a basis for understanding atherogenesis. Circ. Res. 47, 301 (1980)

36. Wolman, M., Sterk, V.V., Gatt, S., Frenkel, M.: Primary familial xanthomatosis with involvement and calcification of the adrenals. Pediatrics 28, 742 (1961)

37. Koschinsky, T.: Angeborene und erworbene Stoffwechselstörungen in arteriellen glatten Muskelzellen und Fibroblasten bei Diabetes mellitus und Hyperlipoproteinämien. Zellkulturuntersuchungen zu Faktoren der Arteriosklerose entwicklung. Habilitationsschrift der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf (1982)

Lebenslauf

10.06.1954	geboren in Demmin/Meckl. als Tochter des Verwaltungsangestellten Heinz Rinkau und seiner Ehefrau Ilse, geb. Schulz
1960 - 1964	Volksschule, Wuppertal
1964 - 1969	Städtisches Mädchengymnasium Helmholtzstraße, Wuppertal, bis zur Obersekunda-Reife
1969 - 1970	Hauswirtschaftliche Berufsschule und Vorpraktikum im Klinikum Barmen, Wuppertal
1971 - 1972	Staatlich anerkannte Lehranstalt für med.-techn. Assistentinnen, Wuppertal
14.12.1972	Prüfung als med.-techn. Assistentin
1975 - 1978	Städtisches Abendgymnasium Wuppertal
12.06.1978	Reifeprüfung
1973 - 1976	Tätigkeit als MTA bei der Bayer AG, Institut für Toxikologie des Pharma Forschungsinstitutes, Wuppertal
1976 - 1978	Tätigkeit als MTA beim Betriebsarztzentrum von Remscheid und Umgebung e.V., Remscheid
seit 01.10.1978	Medizinstudium an der Universität Düsseldorf
26.08.1980	Ärztliche Vorprüfung
27.08.1981	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
26.08.1983	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
17.02.1976	Vermählung mit dem Beamten Manfred Brix
21.09.1982	Geburt der Tochter Anke Brix